

# Transformación genética en frutales

Ariadne Vegas  
Efraín Salazar

Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias.  
Maracay, estado Aragua. Venezuela.

La aplicación de la transformación genética en el mejoramiento de frutales es una alternativa viable para la obtención de variedades más rendidoras, resistentes al estrés biótico o abiótico, frutos con mayor valor nutritivo o que soporten mayor tiempo el almacenamiento. El proceso implica la introducción en la célula vegetal de ADN aislado o encapsulado en vectores, su incorporación al genoma y su acoplamiento, tanto a la maquinaria de replicación como a la expresión genética de la secuencia introducida.

Además del gen de interés, se incorporan genes que permiten identificar la ocurrencia de la transformación y facilitar la selección *in vitro* de las células, órganos o plantas transformadas. Una estrategia de selección que frecuentemente se utiliza, es la incorporación de genes con resistencia a los antibióticos, como kanamicina, higromicina, clo-ranfénicol y otros o también a compuestos químicos particulares. Estos elementos incorporados a los medios de cultivo, afectan a los tejidos susceptibles, permitiendo la supervivencia y selección de los explantes resistentes, regenerándose sólo las células o plantas transformadas. Adicionalmente pueden usarse otros genes que permiten hacer pruebas a tan sólo horas de haber sido utilizada la técnica, generalmente de expresión temporal (transiente), siendo el gen GUS (enzima betaglucuronidasa) uno de los más utilizados (Jefferson *et al.* 1987; Hinchey *et al.* 1988).

Debido a que los agentes patógenos *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* infectan a las plantas en forma natural, induciendo la formación de tumores y raíces respectivamente e introduciendo parte de su genoma en el de la planta, éstos han sido usadas ampliamente para insertar genes en células vegetales, constituyendo parte de los llamados métodos indirectos o mediados por vectores (Assad 1993; Tepfer 1990; Porter 1991). El uso de *Agrobacterium tumefaciens* es el más exitoso y ha permitido transformar dico-

tilodóneas (papa, tomate, tabaco, frutales, leguminosas, zanahorias y otras), gimnospermas (pinos, abetos) y algunas monocotiledóneas.

Adicionalmente, se usan métodos directos como la biobalística o bombardeo de microproyectiles, que permiten introducir genes en diferentes tejidos susceptibles a la selección y regeneración de plantas (Sondahl *et al.* 1989; Figueira y Janick 1993; Lopez-Baez *et al.* 1993; Sandford 1990; Christou 1991), así como la electroporación que permite la permeabilidad de las membranas temporalmente, mediante la exposición de las células a un pulso eléctrico breve o de altos campos eléctricos, facilitando la introducción de secuencias de ADN en las células (Pescitelli y Sukhapinda 1995; Chowrira *et al.* 1995; Arencibia *et al.* 1995; Luong *et al.* 1995; Smith *et al.* 1994; Xu y Li 1994; y Jardinaud *et al.* 1993).

Entre las enfermedades fungosas más importantes que afectan la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) están: la escoba de brujas (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer y las enfermedades causadas por *Phytophthora* spp., las cuales se estima que causen más de 70% de pérdidas (Anderbrham 1985). El mejoramiento convencional para desarrollar plantas resistentes es lento y el uso de fungicidas es costoso e ineficiente, además deja residuos en la almendra. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos alternativos para combatir estos problemas.

La bacteriosis producida por *Erwinia herbicola* es un factor limitante en la producción comercial de mango (*Mangifera indica* L.). La enfermedad ocasiona la pérdida prematura de los frutos pequeños, pudrición del fruto y la formación de cancro con exudado en el tronco y las ramas (Guevara *et al.* 1980). Se han clonado genes que inducen la resistencia a *Erwinia* spp. y que pueden ser incorporados por las técnicas de transformación genética. Hasta la fecha no se ha identificado ningún

mecanismo de resistencia o tolerancia natural efectivo contra *Erwinia* spp. en los materiales de mango conocidos. Si se toma en cuenta la dificultad o casi imposibilidad de mejorar genéticamente al mango, mediante técnicas convencionales, se reafirma la urgencia de utilizar nuevas tecnologías para la obtención de materiales resistentes.

En lechosa (*Carica papaya*), la falta de disponibilidad de programas eficientes de control en enfermedades virales, implica que la inducción de genes resistentes a virus, es de suma importancia en un manejo integrado de enfermedades.

Se han introducido genes que codifican para la proteína de la cápsula viral en plantas leñosas, como una vía de incrementar la tolerancia a un virus específico. Esta estrategia ha sido usada para (PRSV), el virus de la mancha anillada de la lechosa (Oliveira *et al.* 1996), que ocasiona la enfermedad más importante que ataca a este frutal y la que se encuentra más ampliamente distribuida en las zonas productoras del mundo. El porcentaje de incidencia en las áreas donde se encuentra este virus llega a 100% y las plantas de lechosa se vuelven improductivas en uno a dos años después de haberse infectado.

Lo anterior establece la necesidad de incorporar genes con resistencia a enfermedades en cacao, mango y lechosa, mediante técnicas biotecnológicas, por lo que se recomienda la incorporación de genes con resistencia a *Crinipellis pernicioso* y/o *Phytophthora palmivora* en cacao, genes con resistencia a la bacteria *Erwinia carotovora* o *E. herbicola* en mango y genes con resistencia al virus de la mancha anular en lechosa. En la unidad de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA - Ceniap) se conducen investigaciones para el logro de esos objetivos, mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, biobalística o electroporación. El material regenerado deberá ser evaluado inicialmente con las técnicas moleculares anteriormente señaladas y bajo condiciones *in vitro*.

Se utilizan explantes procedentes de poblaciones seleccionadas de cacao, mango y lechosa. En cacao, se usarán los materiales criollos de la colección del INIA del 45 y 95 de la Estación Experimental de Ocumare de la Costa, estado Aragua,

Venezuela. En mango, se obtienen los explantes del banco de germoplasma del Ceniap, en Maracay. En lechosa, se mantiene un huerto de plantas madres de 50 a 100 plantas, con cinco a siete tipos de lechosa que han sido morfológicamente caracterizados y corresponden a la  $F_2 - F_4$ , producto de la autopolinización (Fuguet y Vegas: trabajos de tesis de maestría y doctorado, respectivamente y trabajo en curso de Vegas).

En la transformación se utilizan plásmidos que contienen el gen GUS, resistente a kanamicina y/o tetraciclina y el gen de resistencia al herbicida Basta (PPT) como genes reporteros y/o de selección. Las cepas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium* se cultivan en medio YMB semisólido, más 100 miligramos por litro de rifampicina, por dos días a 28°C y al cumplir el tiempo se resiembran en 25 mililitros de medio líquido de YMB, más la décima parte de la concentración final de antibióticos en el medio semisólido y se incuban en agitación toda la noche a 28°C. El cultivo obtenido se lava eliminando el YMB con M & S líquido (centrifugando la bacteria a 13.000 rpm/minuto), para utilizarlo como inóculo.

En el caso del uso de la biobalística se preparan las partículas de tungsteno con el ADN, según Klein *et al.* (1988) y se usan bajas presiones de helio para incorporar los microproyectiles. La metodología de la electroporación implica la determinación de la composición del buffer, intensidad y tiempo óptimo del pulso eléctrico, resistencia y temperatura adecuada del proceso de electroporación.

En los frutales cacao y mango, se inducen embriones somáticos a partir de embriones cigóticos, como fuente de explantes para los experimentos de transformación (Salazar 1997). En lechosa, se ha demostrado que es posible obtener brotes adventicios a partir de hojas en medio M & S, adicionados con ANA/bencil-aminopurina, en las concentraciones de 0 - 0,1 y 0,1 - 5 miligramos por litros. De igual manera ocurre la embriogénesis somática (ES) cuando se utilizan diferentes tejidos de la lechosa como: hojas y embriones cigóticos, en medios de base M & S con 2,4-D entre 1 y 15 miligramos por litros (Vegas *et al.* 1997). En cacao y mango, se inducirán embriones somáticos a partir de embriones cigóticos, como fuente de explantes para los experimentos de transformación (Salazar 1997). En lechosa, se ha demostrado que es posi-

ble obtener brotes adventicios a partir de hojas en medio M & S, adicionados con ANA/bencil-aminopurina, en las concentraciones de 0 - 0,1 y 0,1 - 5 miligramos por litros. De igual manera ocurre la embriogénesis somática (ES) cuando se utilizan diferentes tejidos de la lechosa, como: hojas y embriones cigóticos, en medios de base M & S con 2,4-D entre 1 y 15 miligramos por litros. (Vegas *et al.* 1997).

Una vez determinadas las condiciones de introducción de los genes, se incorporan el gen o los genes de interés en cada cultivo estudiado, de acuerdo con el objetivo específico. Se realiza la selección *in vitro* positiva de los materiales que presenten los genes marcadores y/o de selección utilizados en la construcción molecular del gen introducido, como indicativo de la presencia del mismo. Se evalúan *in vitro* las células y/o las plantas regeneradas por sus reacciones de resistencia a los agentes patogénicos, la eficiencia de la transformación se evalúa mediante ensayos de NPT II e histológicos para la expresión del gen GUS. Adicionalmente, se realizan pruebas de ELISA y pruebas moleculares, como RAPDS, para corroborar la inserción de las secuencias.

Las masas celulares o plantas transgénicas producidas se conservarán en condiciones controladas, hasta tanto se obtenga la autorización oficial para su cultivo en condiciones de umbráculo o de campo.

## Bibliografía

- Andebrhan, T. 1985. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference. p. 395-402. Stephen, Austin and Son LTD, Hertford.
- Arencibia A.; Molina, P. R.; Delariva, G.; Selmanhousein, G. 1995. Plant Cell Rep. 14: 305 - 309.
- Assad, N. 1993. Tesis de grado. Monterrey, Méx. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. 51 p.
- Chowrira, G. M.; Akella, V.; Lurquin, P. F. 1995. Mol. Biotechnol. 3:17 - 23.
- Christou, P. 1991. Newsletter 66: 2-14.
- Figueira, A.; Janick, J. 1993. Acta Horticulturae 336: 231-238.
- Guevara, M.; Rondón, A.; Solórzano, R. 1980. Agronomía Tropical (Ven.) 30 (1-6): 65 - 76.
- Hinchee, M. A. W.; Connor-Ward, D. V.; Newell, C. A.; McDonnell, R. E.; Sato, S. J.; Gasser, C. S.; Fischhoff, D. A.; Diane, B.; Fraley, R. T.; Horsch, R. B. 1988. Bio/Technology 6: 915-922.
- Jardinaud, M. F.; Soovere, A.; Alibert, G. 1993. Plant Science 93: 177 -184.
- Jefferson, R. A.; Kavanaugh, T. A.; Bevan, M. W. 1987. The EMBO J. 6: 3901-3907.
- Klein, T. M.; Gradziel, T.; Fromm, M. E.; Sanford, J. C. 1988. Biotechnology 6: 559-563.
- López Báez, O.; Bollon, H.; Eskes, A.; Petiard, V. 1993. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences; 316: 579-84.
- Luong, H. T.; Shewry, P. R.; Lazzeri, P. A. 1995. Plant Science 107: 105 -115.
- Pescitelli, S. M.; Sukhapinda, K. 1995. Plant Cell Rep. 14: 712 - 716.
- Porter, J. 1991. Critical Reviews in Plant Sciences 10: 387-421.
- Salazar, E. 1997. Primer encuentro de productores agrícolas con la biotecnología. Maracaibo, Ven. p. 53-65.
- Salazar, E.; Hernández, Y.; Saldaña, G. 1993. Resúmenes de la XLIII Convención anual de ASOVAC. Acta Científica Venezolana v. 44 (sup.1): 45.
- Sanford, J. 1990. Physiologia plantarum 79: 206-209.
- Smith, C. R.; Saunders, J. A.; Vanwert, S.; Cheng, J. P.; Matthews, B. F. 1994. Plant Science 104: 49 - 58.
- Sondahl, M.; Sereduk, T. B.; Chen, Z.; Bellato, C. M. 1989. Patent 88/3078. Rep. of South Africa.
- Tepfer, D. 1990. Physiologia plantarum 79: 140-146.
- Vegas, A.; Trujillo, G.; Tovar, R.; Pino, I.; Mata, J.; Pérez, I.; Velazco, N.; Sandrea, J.; González, A.; Rincón, A.; Yeh, S.; Cabrera, J. L.; Herrera, L.; Colina, S.; Tortolero, M.; Pérez, G. 1997. Primer encuentro de productores agrícolas con la biotecnología. Maracaibo, Ven. p. 67-76.
- Xu, X.; Li, B. 1994. Plant Cell Rep. 13: 237 - 242.

Visite el sitio Web del INIA  
<http://www.inia.gov.ve>